

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa 68
e Desenvolvimento ISSN 0103-0841
Junho, 2006

**Micropropagação in vitro da Cultivar
de Algodão BRS-Verde Via
Organogênese Utilizando as
Citocininas BAP e KIN**



Embrapa

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Luís Carlos Guedes Pinto
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Hélio Tollini

Ernesto Paterniani

Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor-Presidente

Tatiana Deane de Abreu Sá

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Diretores Executivos

Embrapa Algodão

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Auxiliadora Lemos Barros
Chefe Adjunto de Administração

José Renato Cortez Bezerra
Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

ISSN 0103-0841
Junho, 2006

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 68

Micropropagação *in vitro* da Cultivar de Algodão BRS-Verde Via Organogênese Utilizando as Citocininas BAP e KIN

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Nara Wanderley Pimentel
Priscila Simone Ribeiro Aires
Lívia Wanderley Pimentel

Campina Grande, PB.
2006

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 3315-4300
Fax: (83) 3315-4367
algodao@cnpa.embrapa.br
<http://www.cnpa.embrapa.br>

Comitê de Publicações

Presidente: Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

Secretária: Nívia Marta Soares Gomes

Membros: Cristina Schetino Bastos

Fábio Akiyoshi Suinaga

Francisco das Chagas Vidal Neto

José Américo Bordini do Amaral

José Wellington dos Santos

Luiz Paulo de Carvalho

Nair Helena Castro Arriel

Nelson Dias Suassuna

Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes

Revisão de Texto: Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Tratamento das ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Capa: Flávio Tôrres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley

Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

1ª Edição

1ª impressão (2006): 500 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB).

Micropropagação *in vitro* da Cultivar de Algodão BRS-Verde Via
Organogênese Utilizando as Citocininas BAP e KIN, por Julita Maria Frota
Chagas Carvalho e outros. Campina Grande, 2006.

15p. (Embrapa Algodão. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 68).

1. Biotecnologia. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Pimentel, N.W. III. Aires,
P.S.R. IV. Pimentel, L.W. V. Título. VI. Série.

CDD 630.8

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos.....	10
Resultados e Discussão	11
Conclusões	13
Referências Bibliográficas	14

Micropropagação *in vitro* da Cultivar de Algodão BRS-Verde Via Organogênese Utilizando as Citocininas BAP e KIN

Julita Maria Frota Chagas Carvalho¹

Nara Wanderley Pimentel²

Priscila Simone Ribeiro Aires²

Lívia Wanderley Pimentel²

Resumo

A organogênese vem sendo utilizada no desenvolvimento de diversas culturas, como estratégia para a multiplicação *in vitro* sendo, assim, uma alternativa para o melhoramento das espécies. É um processo empírico através do qual são testados a fonte do explante, a composição mineral do meio de cultura, as condições ambientais e o balanço hormonal. Os principais hormônios utilizados na organogênese são as auxinas e as citocininas. As citocininas são hormônios que se caracterizam por induzir grande multiplicidade de brotos no processo organogenético. O objetivo deste trabalho foi induzir o superbrotamento da cultivar de algodão BRS-VERDE, estabelecendo o melhor meio nutritivo suplementado com as citocininas BAP (6-benzilaminopurina) e KIN (kinetina), em diferentes concentrações para o superbrotamento. Utilizou-se o meio Murashige e Skoog (MS), suplementado com BAP e KIN nas concentrações 0,0 (testemunha); 3,0; 3,5; 4,5 mg.L⁻¹, com 10 frascos por tratamento cada um, contendo três explantes por frasco, em um delineamento inteiramente casualizado. A avaliação foi realizada após 60 dias de cultivo, analisando os explantes que superbrotaram e o número de brotos por explante. Os dados foram analisados mediante o procedimento "General Linear Model (GLM)" do SAS, observou-se que os tratamentos MS2 (MS + 3,0 mg.L⁻¹ de BAP e 3,0 mg.L⁻¹ de KIN) e MS3 (MS + 3,5 mg.L⁻¹ de BAP e 3,5mg.L⁻¹ de KIN) favoreceram o melhor superbrotamento de brotos saudáveis, com uma média de 5,30 e 5,04 brotos por explante, respectivamente. Verificou-se que o BAP e a KIN induzem a formação de múltiplos brotos nesta cultivar de algodão.

¹Eng. Agr., Drª. Em Recursos Fitogenéticos da Embrapa Algodão, CEP 174, CEP 58107-720, Campina Grande, PB e-mail julita@cnpa.embrapa.br.

²Estagiárias da Embrapa Algodão graduada do curso de Ciência Biológica da UEPB Estagiário da Universidade Estadual da Paraíba, CEP 58109-753

Micropropagation *in vitro* of cultivating of BRS-Verde cotton saw organogenesis using citocininas BAP and KIN.

Abstract

Organogenesis has been used in the development of various cultures, because it represents a strategy for the multiplication *in vitro*, being thus, an alternative for the improvement of the species. It is an empirical process where the source of the explante, the mineral composition of the way of culture, the ambient conditions and the hormonal balance are tested. The main hormones used in Organogenesis are the auxin and the cytokinin. The cytokinin. are hormones that is characterized for inducing great multiplication of sprouts in the organogenesis process. The objective of this work was to induce the multiple shoots of cotton BRS-Verde, establishing optimum nutritional way supplemented with cytokinin BAP (6-benzyladenine) and KIN (kinetin), in different concentrations for the multiple shoots. The methods Murashige and Skoog (MS) were used, supplemented with BAP and KIN in concentrations 0,0 (witness); 3,0; 3,5; 4,5 mg. L⁻¹, with 10 bottles for each treatment, with each one containing three explantes per bottle, in a delineation entirely casual. The evaluation was done after 60 days of culture, having analyzed the explantes that had super produced and the number of sprouts for explante The data were analysed by using the General Linear Model (GLM) of SAS program. It was observed that the T2 treatments (3,0 MS + mg. L⁻¹ of BAP and 3,0 mg. L⁻¹ of KIN) and T3 (3,5 MS + mg. L⁻¹ of BAP and 3,5mg. L⁻¹ of KIN) had favored optimum multiple shoot of healthy sprouts, with a average of 5,30 and 5,04 sprouts for explante, respectively It was verified that the BAP and the KIN induce the formation of multiple sprouts in this cultivation of cotton.

Index terms: Cotton, multiple shoot, cytokinin.

Introdução

No semi-árido nordestino o algodoeiro é uma das plantas mais cultivadas pelo homem, tendo em vista sua fibra. O aproveitamento da planta do algodão (*Gossypium* spp.) é um dos mais completos, haja vista que dos seus subprodutos são utilizados o óleo, o línter, a farinha de torta e a casca, todos extraídos da semente ou do caroço. No setor agropecuário o algodão está entre as dez maiores fontes de riqueza.

Com o avanço das técnicas de melhoramento foi lançada no mercado a cultivar BRS Verde, proveniente do cruzamento entre a CNPA 7H, herbácea de fibra branca, e a Arkansas Green, ficando a cultivar com as fibras de cor verde. Desenvolveram-se, simultaneamente, estudos para o cultivo do algodão de fibra de cor, sem uso de produtos químicos sintéticos, pesticidas ou fertilizantes.

De acordo com Beltrão et al. (1999), para o sucesso da exploração agrícola no setor da cotonicultura herbácea, ou mesmo em outras culturas, dois aspectos são de extrema importância: a genética, que busca a melhoria da qualidade e o aumento na porcentagem da fibra, o acréscimo na produtividade e a resistência ampla a pragas e, principalmente, a doenças, objetivando-se diminuir custos de produção e agressões ao meio ambiente; o segundo aspecto seria o ambiental visando à produtividade econômica fundamentada na sustentabilidade.

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* pode ser definida como um conjunto de técnicas para favorecer o crescimento de um grande número de células em um ambiente estéril e controlado. O aspecto mais relevante da cultura de tecidos está na área de multiplicação de plantas, conhecida como micropropagação ou propagação clonal, vista que indivíduos produzidos são geneticamente idênticos (RAVEN et al., 2001).

Desta forma, a micropropagação oferece condições para se obter plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longo, em menor espaço de tempo comparado ao melhoramento convencional. É uma técnica de reprodução assexuada, na qual se utilizam explantes do vegetal e, através de divisões celulares induzidas por hormônios vegetais, é produzida uma grande quantidade de indivíduos, genética e fenotipicamente idênticos.

Com isto, uma das metodologias empregadas no processo de cultura de tecidos e micropropagação é o superbrotamento com o qual, a partir de um único

explante cultivado nas condições ideais, possam ser obtidas várias plantas geneticamente idênticas às da plântula matriz e em menor espaço de tempo.

Para a indução do superbrotamento se utiliza a organogênese direta que se refere ao surgimento direto de gemas a partir de tecidos (câmbio vascular, base do pecíolo em dicotiledôneas, base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas, segmentos de raízes, entre outros) que apresentam potencial morfogênético na planta *in vivo* mas que, em geral, não se expressam (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

No processo de obtenção da organogênese *in vitro* são testadas, para cada espécie ou mesmo para cada variedade dentro de uma espécie, as seguintes condições: I) fonte de explante; II) composição mineral do meio de cultura (suas vitaminas e fonte de carbono) III) balanço hormonal e IV) condições ambientais (PERES, 2002).

Os hormônios vegetais são biomoléculas prodigiosas que regulam os processos químicos das plantas, atuando desde a divisão celular em tecidos até fenômenos mais complexos, como floração, frutificação e alongamento do caule, entre outros. A adição dos hormônios vegetais em meios nutritivos tem a função principal de suprir possíveis deficiências de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz.

Os principais hormônios utilizados na organogênese são as auxinas e citocininas. A proporção ou balanço auxina/citocinina em meio de cultura, é aceita como determinante para a resposta organogênica. Altas razões auxina/citocinina geralmente induzem à formação de raiz, enquanto baixas proporções induzem à formação de brotos. Em meios com razões intermediárias de auxina/citocinina ocorre proliferação celular desorganizada, como calos (TAKAHASHI, 2002).

Para a definição de um sistema de regeneração via organogênese direta ou indireta (a regeneração das gemas precedida pela formação de calo), é necessário o estabelecimento de protocolos otimizados para cada espécie devido às características genéticas que determinam respostas diferentes em cada cultura.

Objetivou-se, com este trabalho, induzir o superbrotamento da cultivar de algodão BRS-Verde, estabelecendo o melhor meio nutritivo suplementado com as citocininas BAP (6-benzilaminopurina) e KIN (kinetina), em diferentes concentrações, para o superbrotamento.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cultura de Tecidos Integrado ao Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão – CNPA, localizada na cidade de Campina Grande, PB.

Inicialmente, as sementes da cultivar BRS-Verde desenvolvidas pela Embrapa Algodão foram desinfestadas em solução de hipoclorito, a 1 % de cloro ativo mais uma gota de Tween 20 para cada 100ml de solução durante 20 minutos em agitação seguida de lavagem tripla em água deionizada esterelizada. Na câmara de fluxo laminar as sementes foram inoculadas em tubo de ensaio contendo o meio MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962), suplementado com 3% de sacarose e 0,55% de ágar. As culturas foram incubadas no escuro, por 48-72 horas e mantidas durante 15 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após 25 dias de plantio retirou-se o nó cotiledonar da planta matriz e inoculados em frascos contendo meio MS suplementado com BAP e KIN nas concentrações 0,0 (testemunha); 3,0; 3,5; 4,5 mg.L^{-1} , com 10 frascos por tratamento, cada um contendo três explantes por frasco. Os frascos foram designados de MS 0, que são meios de controle, não contendo adição de hormônios, MS 1 (3,0 mg.L^{-1} BAP + 3,0 mg.L^{-1} KIN), MS 2 (3,5 mg.L^{-1} BAP + 3,5 mg.L^{-1} KIN) e MS 3 (4,5 mg.L^{-1} BAP + 4,5 mg.L^{-1} KIN).

Todos os meios foram suplementados com sacarose a 3% e ágar a 0,65% enquanto o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 120°C . Em todos os casos, a incubação foi mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Utilizaram-se 5 frascos por tratamento, contendo três explantes cada um.

A cada 20 dias, os explantes foram transferidos em condições de câmara de fluxo laminar, para meios frescos, a fim de se evitar problemas de oxidação. A avaliação foi realizada após 60 dias de cultivo, analisando-se os explantes que superbrotaram e o número de brotos por explante.

O delineamento usado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram analisados mediante o procedimento “General Liner Model (GLM)” do “SAS” (2000), version 8.2, e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Resultados e Discussão

Observou-se que o tratamento com o meio MS1 (MS + 3,0 mg.L⁻¹ de BAP e 3,0 mg.L⁻¹ de KIN) favoreceu o melhor superbrotamento de brotos saudáveis, sem presença de toxicidade ou necrose, com média de 5,30 brotos por explante (Tabela 1) (Figura 1). Outro meio que também se destacou foi o MS2 (MS + 3,5 mg.L⁻¹ de BAP e 3,5 mg.L⁻¹ de KIN) com média de 5,04 brotos por explante (Tabela 1). (Figura 2), sem a presença de necrose, enquanto no meio MS0, como já se esperava, não ocorreu formação de múltiplos brotos (Figura 3).

No tratamento com o meio MS3 (MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP e 4,5 mg.L⁻¹ de KIN) a formação de brotos não foi tão satisfatória como os demais tratamentos devido a presença de necrose na área do corte, danificando o restante do explante.

Da mesma forma como apresentado neste trabalho, Tavares et. al (2005), induzindo a multibrotação *in vitro* a partir de gemas cotiledonares da cultivar de algodão CNPA 98-1034 utilizando diferentes concentrações de BAP e KIN, concluíram que as combinações de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP + 1,0 mg.L⁻¹ de KIN favoreceram o maior superbrotamento.

Tabela 1. Valores médios da variável do número de brotos por tratamento na cultivar de algodão BRS-Verde.

Combinação dos Fitorreguladores (mg. L ⁻¹)	Número de brotos Médias
MS0 (0,0 BAP + 0,0 KIN)	1.1000b
MS1 (3,0 BAP + 3,0 KIN)	5.3000a
MS2(3,5 BAP + 3,5 KIN)	5.0400a
MS3 (4,5 BAP + 4,5 KIN)	4.0500a
F _{tratamento}	14,33 **
CV% ¹	29.42%

¹Coefficiente de variação

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

**Significativo (p < 0,01) pelo teste F



Fig.1. Formação de múltiplos brotos. Tratamento com o meio MS1 (MS + 3,0 mg.L⁻¹ de BAP e 3,0 mg.L⁻¹ de KIN)

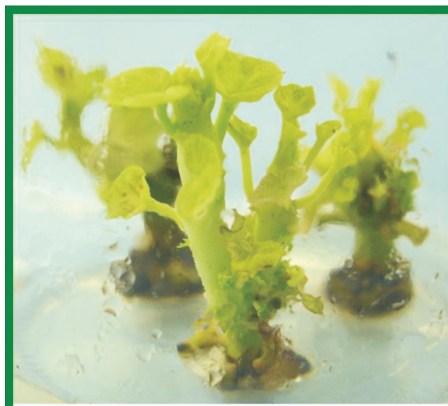


Fig.2. Formação de múltiplos brotos. Tratamento com o meio MS2 (MS + 3,5 mg.L⁻¹ de BAP e 3,5 mg.L⁻¹ de KIN)



Fig.3 Brotos do meio MS0 (testemunha) não apresentando superbrotamento

Carvalho (2000), ao pesquisar a indução de superbrotamento nas gemas cotiledonares de plantas da cultivar CNPA 7H de algodão utilizando, para o desenvolvimento dos explantes o meio MS suplementado com BAP (0,0; 1,0; 2,5 mg.L⁻¹) ou KIN (0,0; 1,0; 2,5 mg.L⁻¹) e concluiu que o meio suplementado com KIN isolado, não teve qualquer efeito na indução de brotos, visto que o meio que produziu o maior número de brotos foi o suplementado com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e 2,5 mg.L⁻¹ de KIN.

Vidal et al. (2005) estudando a indução de múltiplos brotos a partir de meristema apical de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) CNPA ITA-90 II, cultivadas

em meio MS básico com combinações dos hormônios BAP (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg.L⁻¹) e KIN (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg.L⁻¹), constatou maior número de brotos no meio MS suplementado com as combinações 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 3,0 mg.L⁻¹ de KIN. De forma semelhante, Sousa et al. (2004) utilizando a cultivar CNPA 97-668 observaram o maior superbrotamento nas concentrações de 1,5 mg.L⁻¹ de BAP e 1,5 mg.L⁻¹ de KIN.

O sucesso da técnica cultivo *in vitro*, no algodão e em outras culturas, quase sempre está ligado às condições ideais de incubação nos laboratórios. A organogênese no algodoeiro possui inúmeras aplicações e tem dado grande contribuição em toda a área agronômica.

Conclusões

- O meio MS1 (MS + 3,0 mg.L⁻¹ de BAP e 3,0 mg.L⁻¹ de KIN) apresenta os melhores resultados para o superbrotamento na cultivar de algodão BRS-Verde.
- No meio MS2 (MS + 3,5 mg.L⁻¹ de BAP e 3,5 mg.L⁻¹ de KIN), também foi favorável para a indução de múltiplos brotos.
- O meio MS 0, usado como controle, não induziu a formação de múltiplos brotos.

Referências Bibliográficas

- BELTRÃO, N.E de M.; SOUZA, J.G. de; GUERRA, J.S.; TAKIZAWA, E. Manejo cultural do algodoeiro herbáceo na região do cerrado. In: FARIAS, F.J.C.; AGUIAR, P.H.; FREIRE, E.C.; HIROMOTO, D.M.(Ed.) **Mato Grosso: liderança e competitividade**. Rondonópolis: Fundação MT, 1999. p. 70-86. (Fundação MT. Boletim 3).
- CARVALHO, J.M.F.C.; SOUZA, D.M. de; SANTOS, J.W. dos. Indução de superbrotamento e regeneração de planta *in vitro* na cultivar de algodão CNPA 7H. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v.4, n.2, p. 61-65, 2000.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v.1 p.183-260.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, v.15 p. 473-497, 1962.
- PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 25, p. 44-48, 2002.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHOHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6. Ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2001.
- SOUZA, E.B.M.; LIMA, L.H.G.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; SANTOS, J.W.;
- VIDAL, M.S. Indução *in vitro* de superbrotamento a partir de meristema apical de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) CNPA 97-668. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 55; ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS DE MG, BA E ES, 26., 2004, Viçosa. **Anais...** p. 178.
- TAKAHASHI, E.K. **Transferência do gene *atacina A* para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TAVARES, A.C.M.; PINHEIRO, M.P.N.; JERÔNIMO, J.F.; CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. Indução de multibrotações *in vitro*, a partir de gemas cotiledonares de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) da cultivar CNPA 98 - 1034. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 5., 2005, Salvador. **Anais...**Campina Grande: Embrapa, 2005. p.11.

VIDAL, M.S.; CARVALHO, J.M.F.C.; LIMA, L.H.G. DE M.; SOUSA, E.B. DE M.; SANTOS, J.W. dos. **Indução de múltiplos brotos *in vitro* a partir de ápices caulinares da cultivar de algodão CNPA-ITA 90II.** Campina Grande:Embrapa Algodão, 2005. 17p. (Embrapa Algodão. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 63)

Embrapa

Algodão

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

